Schwefelfarbstoffe in der Histologischen Technik
Ein Farbstoffsortiment für die Licht- und Elektronenmikroskopie

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Reinhold Stober

Saarbrücken
1974

AUS DER FACHRICHTUNG ANATOMIE
DES FACHBEREICHS 3 - THEORETISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

SCHWEFELFARBSTOFFE IN DER HISTOLOGISCHEN TECHNIK

Ein Farbstoffsortiment für die Licht- und Elektronenmikroskopie

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1974

vorgelegt von

Reinhold Stober
geb. am 20. Februar 1949 in Naumburg/Saale

Dekan : Professor Dr. med. G. A. JUTZLER
Referenten: Professor Dr. med. W. SPECHT
Professor Dr. med. G. DHOM

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 11.6.74 abgelegt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547302_0011

SCHWEFELFARBSTOFFE IN DER HISTOLOGISCHEN TECHNIK

Ein Farbstoffsortiment für die Licht- und Elektronenmikroskopie

Inhaltsverzeichnis

A Textilfarbstoffe in der Histologie..... S. 3

B HYDROSOL-Farbstoffe - wasserlösliche Schwefelfarbstoffe..... S. 4

I Konstitution..... S. 5

II Färbeverfahren..... S. 8

III Möglichkeiten der Farbstoffixierung..... S. 11

C HYDROSOL-Farbstoffe in der Histologie..... S. 12

I Allgemeine Voraussetzungen für die Versuche... S. 12

II Material und Methode..... S. 13

D Befunde..... S. 20

E Diskussion..... S. 28

F Anwendungsbeispiele und Färberezepte..... S. 38

G Zusammenfassung..... S. 53

H Literatur..... S. 54

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Bezeichnungen: HYDROSOL, HYDROSOLLICHT und IMMEDIALINDON sind eingetragene Warenzeichen der Firma Cassella Farbwerke Mainkur AG.

A Textilfarbstoffe in der Histologie

Seit Einführung der Färbetechnik in die Histologie dienen Textilfarbstoffe zur Kontrastierung lichtmikroskopischer Präparate. Während die moderne Farbstoffchemie die Textilfärberei in den letzten Jahrzehnten geradezu revolutioniert hat, haben die Histologen diese Entwicklung bislang kaum zur Kenntnis genommen. Das ist insofern verwunderlich, als die histologische Färbung seit je eine empirische Wissenschaft war. Bei Berücksichtigung einiger Besonderheiten steht zu erwarten , daß sich gewisse Färbemechanismen auf biologisches Substrat übertragen lassen und daß auf diese Weise neue histologische Färbungen gefunden werden können.

Sinnvoll und erfolgversprechend wird dies nur sein, wenn einige Voraussetzungen erfüllt sind.

Es sollte:
1. der Färbevorgang dem Substrat zugemutet werden können.
2. der Farbstoff in den in der Histologie üblichen Lösungsmitteln löslich sein.
3. der Farbstoff einheitlich sein oder eine reproduzierbare Zusammensetzung aufweisen.
4. der Farbstoff für tierisches und pflanzliches Material geeignet sein.
5. die Licht- und Lösungsmittelechtheit gut sein.
6. der Mechanismus der Farbstoffbindung und -fixierung bekannt sein.

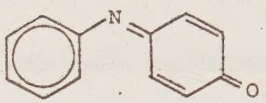
B HYDROSOL-Farbstoffe - wasserlösliche Schwefelfarbstoffe

Die herkömmlichen Schwefelfarbstoffe, die eine mehr als hundertjährige Entwicklung hinter sich haben - nach OTTO (1962) fand TROST 1861 den ersten Schwefelfarbstoff - erfüllen einen Teil der oben genannten Forderungen nicht: Einmal sind sie nur bei hohen OH-Ionenkonzentrationen wasserlöslich , zum anderen ist ihr Herstellungsverfahren so grob , daß es sich bei jeder Charge um Gemische recht unterschiedlicher Zusammensetzung handelt.Besonders auf grund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit erklärt HARMS (1965) sie für die Histologie als ungeeignet.
Im Jahre 1957 brachte die Cassella Farbwerke Mainkur AG ein Sortiment mit verbesserter Wasserlöslichkeit auf den Markt. Es hieß zunächst IMMEDIAL-Farbstoff "Hydrosol", die heutige Bezeichnung ist HYDROSOL-Farbstoff. Es handelt sich um chemisch veränderte und damit wasserlöslich gewordene Formen der herkömmlichen Schwefelfarbstoffe. (HEID, 1963)
Schon lange ist bekannt, daß die meisten Schwefelfarbstoffe durch Behandlung mit Sulfiten oder Bisulfiten in leicht wasserlösliche Verbindungen übergehen (D.R.P.88392 ,1895; LANGE, 1912).Dementsprechend wird die Wasserlöslichkeit durch Sulfitolyse der diese Farbstoffmoleküle kennzeichnenden Disulfid-Brücken erreicht, die zu Thiosulfatgruppen (Bunte-Salze) führt (HEID, 1963). Damit wurde eine Löslichkeit bis zu 2oo g/l H_2O erzielt (HYDROSOL-Musterkarten).Verdünnte wässrige Lösungen sind in einigen Fällen in einem pH-Bereich von12 bis2 möglich.

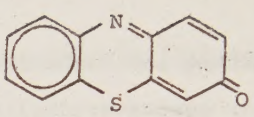
Die zur Färbung und Farbstoffixierung notwendigen Reaktionen laufen unter gewebsverträglichen Bedingungen ab.
HYDROSOL-Farbstoffe werden für Baumwolle eingesetzt; die feste Bindung von Schwefelfarbstoffen an tierische Kolloide (z.B . Leim, Casein) wurde schon 19o8 von CASSELLA als Patent angemeldet (D.R.P. 225314).
Chemische Einheitlichkeit ist auch durch das Herstellungsverfahren der HYDROSOL-Farbstoffe nicht gewährleistet,doch wurden mit verschiedenen Chargen die gleichen Ergebnisse erzielt.
Welche Beziehungen der Farbstoff mit dem Substrat eingeht ist nicht sicher geklärt; der Fixierungsmechanismus dagegen ist chemisch formulierbar und läßt sich vielfach abwandeln.
HYDROSOL-Farbstoffe sind sehr leicht zu verlacken,außerdem ist von einigen Vertretern bekannt, daß sie mit Schwermetallen Komplexe in Form von Chelaten bilden.

I Konstitution

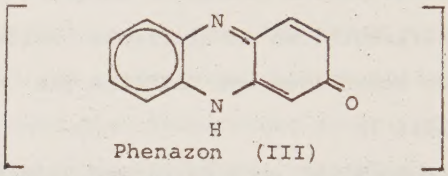
Die Schwefelfarbstoffe sind nach Herstellungsverfahren und Ausgangsprodukten zu unterteilen in Back- und Kochfarbstoffe.
Backfarbstoffe werden durch " Verbacken" , d.h. durch trockene Schmelze bei Temperaturen über 2oo°C von aromatischen Ausgangsstoffen, vor allem Aminen und Nitroverbindungen , mit Schwefel oder Polysulfiden gewonnen. Es handelt sich um gelbe bis braune Farbtöne. Durch Kondensation über Thiazolringe entstehen Verbindungen, die der technischen Primulinbase verwandt sind. Mit Sicherheit stellen sie ein Gemisch recht verschiedener



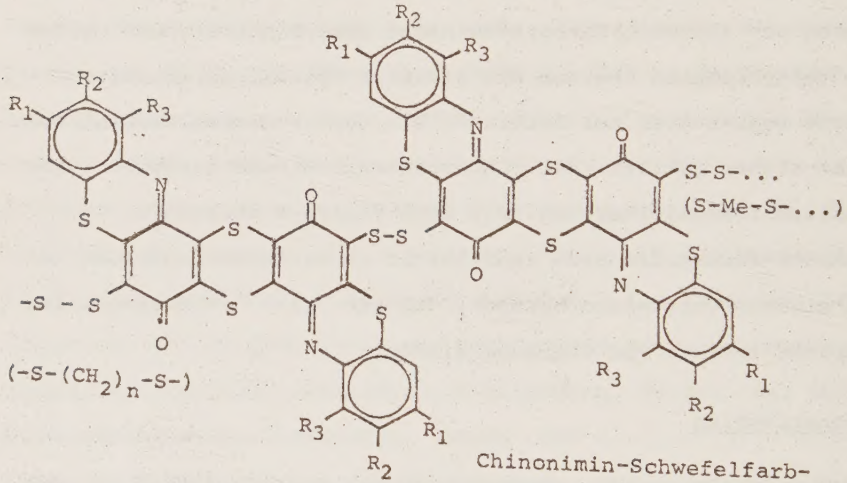
Phenylchinonmonimin (I)



Phenthiazon (II)

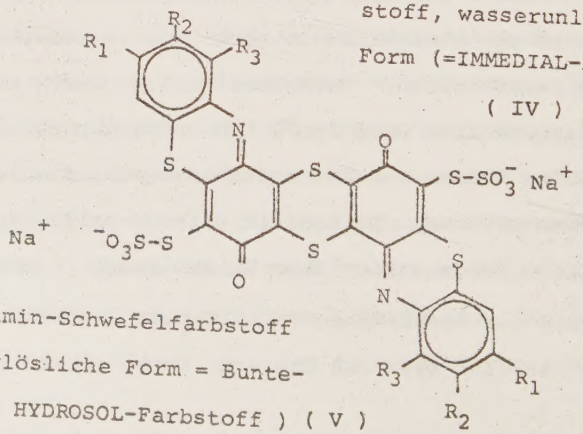


Phenazon (III)



Chinonimin-Schwefelfarbstoff, wasserunlösliche Form (=IMMEDIAL-Farbstoff)

(IV)



Chinonimin-Schwefelfarbstoff (wasserlösliche Form = Bunte-Salz = HYDROSOL-Farbstoff) (V)

Verbindungen dar (SCHUBERT, 1947; ZERWECK, RITTER, SCHUBERT, 1948).

Kochfarbstoffe dagegen werden durch "Verkochen" der Ausgangsstoffe in wässriger oder alkoholischer Lösung bei 80 - 150 °C mit Schwefelüberschuß hergestellt.Allen zur Verschwefelung benutzten Stoffen ist die Chinonimin-Gruppierung gemeinsam, wonach diese Gruppe der Schwefelfarbstoffe ebenfalls benannt wird. Die Farben sind: Schwarz,Rotbraun, Blau und Grün (SCHUBERT, 1947; ZERWECK, RITTER, SCHUBERT, 1948).

Vertreter beider Schwefelfarbstoffarten werden als HYDROSOL-Farbstoffe angeboten. Es hat sich im Laufe der Untersuchungen herausgestellt, daß die Backfarbstoffe nicht in gleichem Maße geeignet sind, weswegen hier nur auf die Kochfarbstoffe näher eingegangen werden soll.

Die Chinoniminschwefelfarbstoffe sind als Abkömmlinge des Phenylchinonmonimins (I) zu betrachten. Durch die Schwefelung entsteht ein Phenthiazon (II), es sei denn, das Ausgangsmaterial ist bereits ein Heterocyclus mit einem Sauerstoff- oder Stickstoffatom (z.B. Phenazon (III) im Falle des Hydrosolrotbraun 3B). Der wesentliche Vorgang der Schwefelung besteht- so schließt man aus dem Verhalten synthetisierter Vergleichsprodukte- in der Verknüpfung zweier Phenthiazone über Monosulfidbrücken zum Thianthrenringsystem (IV). Zugleich werden diese Bausteine über Disulfidbrücken zur wasserunlöslichen Form der Kochfarbstoffe vernetzt. Allerdings ist eine Ausbeute an Thianthren selbst bei der Laborsynthese aus Trichlorthiazon

nur zu maximal 45 % erreicht worden, da weitere Reaktionsmöglichkeiten bestehen, die nur zur Bildung von Monosulfiden führen. Daneben können sowohl mehrfach verkettete Monosulfide als auch Di- und Polysulfidbrücken als Verbindung der Thiazone entstehen. Der Farbwert dieser Produkte wird durch Substitution am benzoiden Kern des Thiazons bestimmt. Für manche sind Modellformeln anzugeben, indem man von den Ausgangsstoffen auf die Zusammensetzung der Endprodukte schließt, bei anderen ist auf diese Weise die Konstitution nicht zu ermitteln (ZERWECK, RITTER, SCHUBERT, 1948).

Die Herstellung der HYDROSOL-Farbstoffe ist eine Spaltung der wasserunlöslichen IMMEDIAL-Farbstoffe in ein Bunte- Salz und eine "teilreduzierte" Form (V und VII; Mitteilungen der CASSELLA). Dieses Aufbrechen der S-S-Bindung mit $NaHSO_3$ führt zu einem pH-Wert von ca. 10-11.

$$\underset{\text{IMMEDIAL-Farbstoff}}{(Fb)\text{-}S\text{-}S\text{-}(Fb)} + NaHSO_3 \longrightarrow \underset{\text{Bunte-Salz}}{(Fb)\text{-}S\text{-}SO_3Na} + \underset{\text{"teilreduzierte" Form}}{(Fb)\text{-}SH}$$

II Färbeverfahren

Zur Erlangung der gewünschten Faseraffinität muß eine sogenannte Leukoform (VI) hergestellt werden, die als Hydrierungsprodukt der " teilreduzierten" Form aufgefaßt werden kann: das chinoide System geht in das hydrochinoide über, die Vernetzung der Bausteine der IMMEDIAL-Farbstoffe ist aufgehoben, durch die entstandenen freien SH-Gruppen wird der Farbstoff in

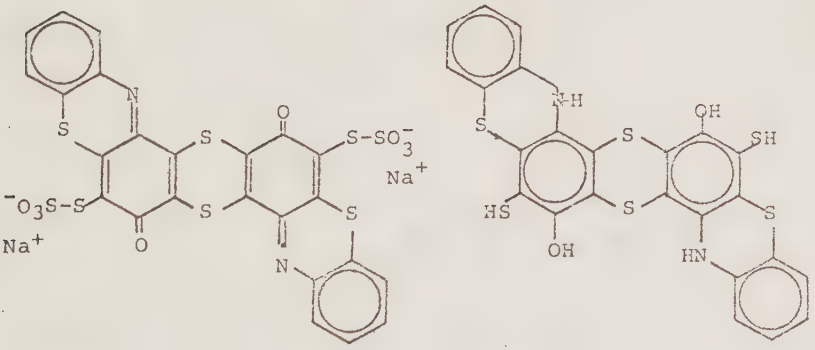
alkalischem Milieu wasserlöslich.

$$(Fb)\text{-}S\text{-}S\text{-}(Fb) \rightleftharpoons (Leuko\text{-}Fb)\text{-}SH \longleftarrow (Fb)\text{-}S\text{-}SO_3Na$$

wasserunlösliche Form	wasserlösliche	wasserlöslich
IMMEDIAL-Farbstoff	Leukoform	nicht affin
	faseraffin	HYDROSOL-Farbstoff

Die Leukoform ist also bei den herkömmlichen Schwefelfarbstoffen wie bei den HYDROSOL-Farbstoffen die eigentlich aufziehende Molekülform.

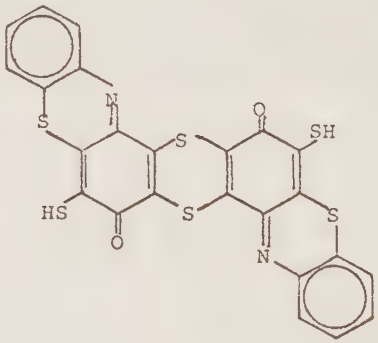
Für die alkalische Reduktion wird vom Hersteller"Sulfhydrat F" angeboten (NaHS in 21%iger wässriger Lösung), eine Reihe anderer Reduktionsmittel sind jedoch ebenfalls geeignet , z.B. Glukose in alkalischer Lösung (HEID, 1965).Für die HYDROSOL-farbstoffe ist der Vorgang folgendermaßen zu beschreiben:



Wasserlösliche Form (HYDROSOL-Farbstoff) (=Bunte-Salz) (V) —alk. Red.→ Leukoform (VI)

Üblicherweise zieht diese Leukoform auf das Färbegut auf. Dabei ist die Affinität so groß, daß es nicht nur zu einer Durchtränkung, sondern sogar zu einer Anreicherung des Farbstoffes auf der Faser kommt.

Für bestimmte andere Materialien als Baumwolle, z.B.Leder, Moleskin, sollte die Flotte einen pH von 4 bis 4,5 nicht überschreiten, um die Endengleichheit alkalischer Waren zu gewährleisten (RINNEBERG, 1957). Bei diesem Verfahren liegt der Farbstoff nicht in der Leukoform vor, sondern in einer"teilreduzierten"Form (VII) :



"teilreduzierte" Form (VII)

Sie entsteht durch Abspaltung der SO_3-Gruppen vom Sulfidschwefel des HYDROSOL-Farbstoffs und bildet sich allmählich in Lösungen außerhalb des pH-Bereichs von etwa 8 bis 10,ohne daß sich das Aussehen der Flotte dabei ändert.

III Möglichkeiten der Farbstoffixierung

Der Farbstoff liegt im durchtränkten Gewebe entweder in der Leukoform oder in der wasserlöslichen Form als HYDROSOL-Farbstoff oder in der "teilreduzierten" Form vor. Drei Mechanismen stehen zur Verfügung, den Farbstoff im Substrat zu fixieren:

1. In Umkehrung der alkalischen Reduktion erfolgt die Bildung der wasserunlöslichen Form unter Einwirkung von sauren oder basischen Oxydationsmitteln.
2. Bifunktionelle Alkylierungsmittel können als Bindeglied zwischen die SH-Gruppen der Leukoform oder der " teilreduzierten" Form eingefügt werden.
3. Außerdem können die Merkaptogruppen mit mehrwertigen Metallionen verbunden werden (Verlackung).

Diese drei Reaktionen führen nicht nur zur Molekülvergrößerung, sondern über die Umwandlung des hydrochinoiden in ein chinoides System auch zur farbstarken, wasserunlöslichen Form. [1]) Ausgehend von der Leukoform ist der Erfolg der Nachbehandlung also leicht an der Farbvertiefung zu erkennen. Ist das Substrat mit dem Bunte-Salz eingefärbt, muß das Fixierungsmittel zunächst die SO_3-Gruppen beseitigen, was am einfachsten durch saure Reaktion zu erreichen ist.

---

[1]) Unter "wasserunlöslicher Form" wird in diesem Zusammenhang jede Molekülvergrößerung verstanden, nicht nur diejenige über Di- oder Polysulfidbrücken! (siehe Formel IV die Zusätze in Klammern).

C HYDROSOL-Farbstoffe in der Histologie

I Allgemeine Voraussetzungen für die Versuche

Für die Untersuchungen wurden von der Cassella Farbwerke Mainkur AG freundlicherweise Substanzproben zur Verfügung gestellt. Zunächst gelangten Muster handelsüblicher Ware zur Anwendung. In späteren Versuchen wurde aber auch separat abgefüllter, unverschnittener - nicht mit Salz eingestellter - Farbstoff benutzt.

Die HYDROSOL-Farbstoffe werden in den Musterkarten als „Heißfärber geführt, das bedeutet, sie werden bei Färbetemperaturen bis zu 90°C dem Gewebe angeboten. Im Zusammenhang mit den notwendigen hohen pH-Werten erweisen sich solche Temperaturen auch kurzzeitig für histologische Präparate als unzuträglich. Alle Färbeversuche wurden deshalb bei Zimmertemperatur vorgenommen

In der Textilfärberei werden der HYDROSOL-Flotte im allgemeinen erhebliche Mengen Soda zugefügt (RINNEBERG, 1957; MÜLLER, 1958; KLOPFSTOCK, TITZKA, 1960). Dieser Zusatz hat mehrere, zum Teil nur empirisch begründbare Aufgaben. Zur Vermeidung der dabei sich noch verstärkenden Alkalität der Flotte wurden in unseren Versuchen keine derartigen Zusätze verwendet.

II Material und Methode

1. Farbstoffproben:

Backfarbstoffe: Hydrosolgelb RR, Hydrosollichtbraun GGL, Hydrosollichtkatechu RL.

Kochfarbstoffe: Hydrosolrotbraun 3B, Hydrosolblau R conz. Hydrosollichtgrün 3B, Hydrosolschwarz B.

Diese Proben waren mit Na_2SO_4 standardisiert, außerdem mit anderen Farbstoffen auf die genaue Nuance eingestellt. An unverschnittenen , vor der Standardisierung abgefüllten Proben standen zur Verfügung:

Kochfarbstoffe: Hydrosollichtblau FFR, Hydrosollichtgrün 3B Hydrosolgrün GG, Hydrosolblau R conz., Hydrosoldirektblau RL, Hydrosolrotbraun 3B, Hydrosolschwarz B.

Zu Vergleichsuntersuchungen wurde als wasserunlöslicher Schwefelfarbstoff Immedialindon RR benutzt.

2. Untersuchungsmaterial:

Gefärbt wurden Paraffinschnitte von menschlichen und tierischen Geweben bzw. Organen:

Magen (Mensch,Kaninchen) , Niere (Ratte,Maus) , Muskulatur (Mensch, Maus) , Herz (Rind) , Leber (Ratte,Kaninchen) , Darm (Mensch,Maus) , Pankreas (Katze,Mensch) , Trachea (Rind) , Blutgefäße (Rind,Schwein) Haut (Mensch) , glatte Muskulatur,Harnblase (Frosch) , Gehirn (Ratte, Maus,Kaninchen).

Als Fixierungsmittel dienten: BOUIN, CARNOY, Formol (1:4, 1:9), SCHAFFER, Susa, ZENKER, (s.ROMEIS, 1968).

Die Eignung des HYDROSOL-Farbstoffs als Vitalfarbstoff wurde an weißen Mäusen und Kaninchen erprobt.(siehe unter 4.)

3. Untersuchungen an Paraffinschnitten:

3.1. Färbungen aus verschiedenen Flotten:

3.1.1. Wässrige Lösungen:

a) 0,2 - 10 %ig, ungepuffert, Färbezeit 10 - 40 min.

b) 0,1 - 1 %ig, gepuffert:

Phosphatpuffer	(Sørensen)	pH 6 - 8
Citronensäure/Phosphat	(McIlvaine)	pH 5 - 8
Barbital/HCl	(Michaelis)	pH 7 - 8
Tris/HCl		pH 8 - 9

(s.Documenta GEIGY,Wissenschaftliche Tabellen 7.Aufl.,1968)

Färbezeit jeweils 10 - 30 min.

c) 0,1 - 1 %ig, mit HCl (n/1) eingestellt auf pH-Werte von 6 - 1.

Färbezeit 2 - 20 min.

3.1.2. Wässrige, reduzierte Lösungen:

50 ml 1 %ige Lösung wurden mit 2 ml Sulfhydrat F (= NaSH, 21 %ig) reduziert. Färbezeit 1 - 10 min.

Anschließend Nachbehandlung mit:

a) Perjodsäure	1 %ig, wässrig,	30 sec.
b) $K_2Cr_2O_7$	1 %ig, wässrig,	30 sec.
c) H_2O_2	3 %ig, wässrig,	30 sec.
d) $FeSO_4$	1 %ig, wässrig,	10 min.
e) $CuSO_4$	1 %ig, wässrig,	10 min.
f) $CoCl_2$	1 %ig, wässrig,	10 min.

3.1.3. Methanolische Lösung, gesättigt,Färbezeit 30 min-3h.

3.1.4. Methanolische Lösung, gesättigt, reduziert mit Sulfhydrat F (= NaSH ,21 %ig),1 ml auf 50 ml Lösung, Färbezeit 5 - 15 min.

Anschließend Nachbehandlung mit:

a) Perjodsäure 1 %ig, wässrig, 30 sec.

b) Epichlorhydrin, rein, 10 min.

c) 1,2-Dichloräthan, rein, 10 min.

3.1.5. Wässrige, 1 %ige, ungepufferte Lösungen mit Elektrolytzusatz:

a) NaCl : 1%, 2%, 4%, 8%, 10% .

b) $MgCl_2$: 1%, 2%, 4%, 8% .

c) $AlCl_3$: 1% .

Färbezeit 5 - 20 min.

3.2. Stabilitätsprüfung der Farbstoffbindung:

Die Stabilität wurde für die nach 3.1.1. bis 3.1.5. ausgeführten Färbungen gegenüber folgenden Einwirkungen geprüft:

3.2.1.	KOH	n/100	24h.
3.2.2.	HCl	n/10	24h.
3.2.3.	Harnstoff	20 %ig,wässrig,	24h.
3.2.4.	Dimethylformamid, rein		24h.
3.2.5.	Sulfhydrat F (= NaSH, 21 %ig,wässrig)		10 min.

3.3. Untersuchung der Farbstoffixierung durch Nachbehandlung:

Nach 3.1.1. durchgeführte Färbungen wurden folgenden Fixierungsmethoden unterworfen und ihr Erfolg nach den Stabilitätsprüfungen mit KOH, Dimethylformamid und Sulfhydrat F beurteilt:

3.3.1. Oxydation:

a) Perjodsäure 1 %ig, wässrig, 5 min.

b) $K_2Cr_2O_7$ 1 %ig, wässrig, 5 min.

c) H_2O_2 3 %ig, wässrig, 5 min.

3.3.2. Bifunktionelle Alkylierungsmittel:

a) Epichlorhydrin, rein, 72 h .
b) 1,2-Dichloraethan, rein, 72 h .

3.3.3. Verlackung und Komplexbildung:

a) $FeSO_4$ 5 %ig, wässrig, 10 min , 2 h .
b) $CuSO_4$ 5 %ig, wässrig, 10 min , 2 h .
c) $CoCl_2$ 5 %ig, wässrig, 10 min , 2 h .

3.4. Histochemische Untersuchungen über die Abhängigkeit der Farbstoffbindung von funktionellen Gruppen im Substrat:

3.4.1. Desaminierung (van Slyke's Reagenz) 24 und 60 h bei Raumtemperatur.

3.4.2. Acetylierung (Essigsäureanhydrid-Pyridin-Gemisch) 1 und 24 h bei Raumtemperatur.

3.4.3. Methylierung (1 % HCl in abs.Methanol) 24 , 48 und 90 h bei Raumtemperatur.

3.4.4. Blockierung von Tyrosin,aromatische OH-Gruppen (Dinitrofluorbenzol) 24 h bei 4 °C. (s. PEARSE , 1960 und SPANNHOF, 1967)

4. Versuche zur Vitalfärbung:

4.1. Subcutane Injektion

Versuchstier : weiße Maus.
Lösungen: Hydrosolblau R conz. 0,05 %ig ; 0,1 %ig ; 0,5 %ig ; gepuffert auf pH 7,4 mit Barbital/HCl.
gesamt applizierte Mengen: 3 mg ; 8 mg ; 30mg Farbstoff.
Versuchsdauer: 12 Injektionen über einen Monat verteilt, 1 Monat Überlebenszeit.

4.2. Enterale Verabreichung im Trinkwasser.

Versuchstier : weiße Maus, adult.
Lösung: Hydrosollichtgrün 3B , 0,1 %ig, mit n/10 HCl auf pH 7,0 eingestellt. Gesamt aufgenommene Menge: 250ml.
Versuchsdauer: 2 Monate.

4.3. Intravenöse Injektion

Versuchstier: Kaninchen.

Lösung: Hydrosollichtgrün 3B 10 %ig, mit n/10 HCl auf pH 7,4 eingestellt.

applizierte Menge: 1x 100 mg/kg Körpergewicht

Versuchsdauer: 72 h .

4.4. Intraperitoneale Injektion

Versuchstier: weiße Maus.

Lösungen: Hydrosollichtblau FFR, Hydrosollichtgrün 3B, Hydrosolgrün GG, Hydrosoldirektblau RL, Hydrosolrotbraun 3B , Hydrosolblau R conz., Hydrosolschwarz B.
Alle Lösungen 1 %ig, wässrig, mit n/10 HCl auf pH 7,4 eingestellt.
Applizierte Menge: 1x 10mg (= 1ml)/Tier.
Versuchsdauer: 16h.

4.5. Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf vital aufgenommenen Farbstoff:

Beurteilung nach Auswaschen des Farbstoffs im Fixierungsmittel und nach Farbstoffgehalt im fertig verarbeiteten Präparat.

Fixierungsmittel: a) Formol (1:4)
b) BOUIN
c) ZENKER

5. Darstellbarkeit der HYDROSOL-Farbstoffe im Elektronenmikroskop.

Verwendet wurden: Hydrosollichtblau FFR, Hydrosollichtgrün 3B und Hydrosolblau R conz.

Lymphknoten aus Versuch 4.1. wurden in Glutaraldehyd (6 %ig in Veronalpuffer nach SJÖSTRAND) 9 Stunden fixiert und vor der Einbettung in Araldit wie folgt behandelt:

5.1. Durchtränkung mit $CoCl_2$, 5 %ig, wässrig, 9 h , anschließend nachfixiert mit Osmiumtetroxyd.

5.2. Durchtränkung mit $CuSO_4$ 5 %ig, wässrig, 9 h , anschließend nachfixiert mit Osmiumtetroxyd.

5.3. Nachfixierung mit Osmiumtetroxyd.

5.4. Kontrolle (Fixierung in Glutaraldehyd, keine Nachbehandlung mit Metallsalzen oder OsO_4).

Entwässerung in Alkohol, Araldite einbettung, Herstellung der Schnitte auf dem REICHERT-Mikrotom nach SITTE.

Elektronenmikroskop: ZEISS EM 9a

Neben der üblichen Nachkontrastierung mit Bleicitrat und Uranylacetat wurde an Schnitten von 5.4. (Kontrolle) die Kontrastbildung durch folgende Lösungen geprüft:

5.5. a) $CoCl_2$ 5 %ig, wässrig, 15 min.
b) $FeSO_4$ 5 %ig, wässrig, 15 min.

6. Untersuchungen des Farbstoffes in vitro

6.1. Löslichkeit der Farbstoffe:

Als Kriterium der Löslichkeit wurde die Klarheit der Lösungen und ihre Filtrierbarkeit durch SELEKTA-Faltenfilter benutzt. Es wurden also keine streng definiert echten Lösungen angestrebt.

Es wurden Hydrosollichtblau FFR und Hydrosolrotbraun 3B verwendet.

Lösungsmittel: Methanol, Aethanol, Isopropanol, Butanol, Aceton, Chloroform, Diaethylaeter, Dichloraethan, Dioxan, Epichlorhydrin, Dimethylformamid, Methylbenzoat, Pyridin , Terpineol, Tetrachlorkohlenstoff, Xylol.

Die Löslichkeit in H_2O, Methanol und Pyridin wurde für alle HYDROSOL-Kochfarbstoffe geprüft.

6.2. Wanderrichtung im elektrischen Feld.

In Anlehnung an BAKER (1968) wurde in einem einfachen Kataphoreseversuch die Wanderrichtung von Hydrosollichtgrün 3B und Hydrosolrotbraun 3B bei pH 1 und pH 13 ermittelt (8 Volt, 6 - 8 h) .

6.3. Prüfung der Einheitlichkeit der Farbstoffe

a) Dünnschichtchromatographie:

Schicht: DC - Alufolie - Kieselgel MERCK
Fließmittel: nach der elutropen Reihe (s. RANDERATH, S.17, Tab. 5, 1962) und der Mikrozirkulartechnik wurde ein Fließmittel ausgewählt, welches allerdings nur unbefriedigende Trennungen ermöglichte:
H_2O : Pyridin : Methanol = 2 : 1 : 1
Für reduzierten Farbstoff wurde dem Fließmittel Sulfhydrat F zugesetzt (1 ml/ 50 ml), um eine Oxydation und damit Teilchenvergrößerung während der Trennung zu verhindern.

b) Diskontinuierliche Elektrophorese (PLEUGER):
Gesättigte Lösungen von: Hydrosollichtgrün 3B, Hydrosolblau Rconz., Hydrosolrotbraun 3B, Hydrosolschwarz B. (Diese vier einmal standardisiert und einmal ohne Verschnitt) Sowie unverschnittene Fabrikware von: Hydrosollichtblau FFR, Hydrosoldirektblau RL, Hydrosolgrün GG,
wurden mit Glukose versetzt und auf Gelsäulen aufgetragen (Polyacrylamid). pH : 8,3 ; Anfangsspannung: 50 V nach 15 min auf 80 V erhöht; Laufzeit : 1- 3 h . [1])

---

[1]) Für die Durchführung dieser Untersuchung bin ich Herrn und Frau HÜBERS vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes zu Dank verbunden.

D Befunde

In Vorversuchen wurden die handelsüblichen, standardisierten Proben in ihrer Färbung aus 1 %iger wässriger und 1 %iger reduzierter Flotte getestet. Es stellte sich dabei heraus, daß die Backfarbstoffe (die gelben bis braunen Farbtöne) nicht die klaren und detaillierten Bilder lieferten wie die Kochfarbstoffe. Daraufhin wurden alle weiteren Versuche mit Kochfarbstoffen vorgenommen, deren Chemie ohnehin zugänglicher ist, und deren Farben (blau, grün, rotbraun, schwarz) für das mikroskopische Bild geeigneter erscheinen. Backfarbstoffe wurden lediglich zu Nuancierungen verwendet.

Die Löslichkeitsuntersuchungen ergaben entsprechend den auf den Musterkarten der Firma angegebenen Daten eine sehr gute Löslichkeit in Wasser (40 - 150 g/l). Außerdem wurde eine unterschiedlich gute Löslichkeit in Methanol, Pyridin und Dimethylformamid festgestellt. Hydrosolschwarz B dagegen ist nur in DMF (Dimethylformamid) schwach löslich; es nimmt insgesamt eine Sonderstellung ein: konzentrierte wässrige Lösungen (15 %ig) erstarren nach einiger Zeit gallertig; die Kernfärbung ist besonders elektiv; vital appliziert wirkt es toxisch. Wegen des weitgehend gleichen Färbeverhaltens und der guten lichtmikroskopischen Eignung der Farbe Schwarz wurde es jedoch mit untersucht.

Um Auskunft über die Farbstoffeinlagerung und deren Bedingtheiten zu erhalten, wurden einmal die Eigenschaften der Flotte,

zum anderen die des Substrates geändert.

Änderungen des Flotten-pH ergaben eine deutliche Abhängigkeit der Färbung von diesem Parameter: über einem Grenzbereich von pH 5,5 - 6,5 , insbesondere im alkalischen Milieu, ist die Färbung gekennzeichnet durch eine gute Darstellung der Zellkerne, der Nissl-Substanz, der Hauptzellen der Magenschleimhaut, der glatten Muskulatur und der Skeletmuskulatur. Kollagenes Bindgewebe und elastische Strukturen werden nur mäßig gefärbt. Im sauren Bereich kehrt sich das Bild in gewisser Weise um: die Zellkerne liegen hell ausgespart oder nur wenig tingiert im dunkel gefärbten Zytoplasma, kollagene Fasern, Basalmembranen und Becherzellen haben intensiv Farbstoff gebunden. Konzentrationsänderungen der rein wässrigen Lösung beeinflussen die Färbungen nur unwesentlich; allerdings ist das Aufziehen aus verdünnten Lösungen (0,1 %ig) zeitraubend und bei Anwendung ungepufferter, also stark alkalischer Flotten für das Präparat nicht zuträglich (Abschwimmen der Schnitte). Höhere Konzentrationen (bis 10 %ig) werden lediglich bei Hydrosolschwarz B vorteilhaft zur Kernfärbung eingesetzt.

Die Färbung aus reduzierter Flotte ergibt eine universelle Tingierung innerhalb kurzer Zeit (30 sec). Eine Sättigung des Schnittes ist schon nach 3 bis 5 Minuten erreicht. Dabei sind elastische Elemente deutlich intensiver als alle übrigen Strukturen tingiert. Daran ist dieser Färbetyp stets zu erkennen.

Aus methanolischer Lösung zieht der Farbstoff wie aus saurer Lösung auf. Allerdings sind ungleich längere Zeiten, bis zu

drei Stunden, notwendig. Die reduzierte methanolische Lösung gleicht zwar im Färbeergebnis der reduzierten wässrigen, besitzt aber den Vorteil, die Schnitte nicht so schnell vom Objektträger zu lösen.

Diese drei Färbetypen, nämlich aus basischer (pH 8 - 11), saurer (pH 1,5 - 4) und aus reduzierter Flotte werden im folgenden "basische", "saure" und "reduzierte" Färbung genannt. (Abb 1. a, b und c).

Versuche, Flotteneigenschaften durch Elektrolytzusätze zu verändern, ergaben, daß der pH-Wert mit steigendem Zusatz von NaCl und $MgCl_2$ von 10,5 auf 9 absinkt. Bei 4 bis 8 %igem Salzzusatz fällt der Farbstoff nach einiger Zeit (1 - 6 Std.)aus. Mg^{++}-Ionen lassen den Farbstoff rascher und intensiver aufziehen, allerdings leidet die elektive Darstellung der Hauptzellen und der Zellkerne erheblich. Aluminiumzusatz (Al^{+++}) , ebenfalls als Chlorid, senkt den Flotten-pH auf 4 und erzeugt aus manchen HYDROSOL-Farbstoffen (Blau R, FFR und RL) eine Leukoform mit untypischen Färbeeigenschaften: Oxydation mit Perjodsäure am Schnitt führt zur farbstarken Form aber nicht zur Vernetzung; der Farbstoff bleibt mit alkalischen Lösungsmitteln auswaschbar, wobei er im kollagenen Bindegewebe am längsten haftet (Blau FFR). Andere HYDROSOL-Farbstoffe werden durch Zusatz von $AlCl_3$ nicht in die Leukoform überführt, z.B. Rotbraun 3B.

Substratänderungen wurden durch Blockierung bzw.Entfernung bestimmter funktioneller Gruppen (-NH_2, -OH, -COOH) erreicht.

Dabei wurde der Einfluß auf alle drei Färbetypen untersucht. Die Färbung aus reduzierter Flotte ist von Substratvorbehandlungen völlig unabhängig. Die "basische" Färbung wird offensichtlich weitgehend von den NH_2-Gruppen des Gewebes bestimmt: Acetylierung und Desaminierung führen nämlich zu einer erheblichen Abnahme der Färbungsintensität. Unter diesen Bedingungen tritt im Vergleich zu nicht vorbehandelten Schnitten eine verstärkte Elastika-Zeichnung auf. Methylierung und Blockade der aromatischen OH-Gruppen durch Dinitrofluorbenzol haben keinen Einfluß auf die "basische" Färbung. Die "saure" Färbung nimmt ebenfalls stark ab, wenn die NH_2-Gruppen im Gewebe entfernt werden. Im Gegensatz zur "basischen" Färbung bedingt die Methylierung, das heißt die Ausschaltung der Carboxylgruppen, eine erhebliche Vermehrung der Farbstoffbindung.

Die in der histologischen Technik gebräuchlichen Fixierungsmittel beeinflussen die chemische Struktur des Substrates sicherlich in unterschiedlicher Weise. Orientierende Versuche zeigen jedoch, daß eine starke Abhängigkeit der mit wasserlöslichen Schwefelfarbstoffen erzielten Ergebnisse von der Fixierung nicht besteht. Lediglich formolfixierte Präparate benötigen eine etwas längere Färbedauer.

Auch die Untersuchungen zur Stabilität gegenüber verschiedenen Nachbehandlungen sollten Aufschluß geben über die Art der Beziehungen zwischen Farbstoff und Substrat. Es wurden wiederum die drei Färbetypen untersucht. Alle Färbungen sind durch Reduktion mit unverdünntem Sulfhydrat F und anschließendem Aus-

waschen in N/100 KOH aus dem Schnitt zu entfernen. Nur wenn die reduziert aufgezogene Leukoform mit Kobalt-oder Eisen(II)-Salzen in die farbstarke und vernetzte Form umgewandelt wird, sind die Verknüpfungen so stabil, daß ein gewisser Farbstoffanteil auch nach dieser Behandlung im Schnitt verbleibt.
Die "basische" Färbung zeigt eine geringere Stabilität gegenüber Lauge und DMF.Die Nachbehandlung mit diesem Mitteln führt jedoch nur zur Abblassung,nicht zum völligen Farbverlust. Der verbleibende Farbstoff erweist sich durch die Darstellung der Elastika als reduziert aufgezogener Anteil.
Die Färbung aus "saurer" Flotte kann mit Lauge und DMF ganz, mit Harnstofflösung zu geringem Teil entfernt werden.Auch die methanolische Färbung ist in gleicher Weise unbeständig.
Der reduziert aufgezogene und anschließend oxydierte Farbstoff erweist sich den Stabilitätsprüfungen ohne geringste Abblassung als gewachsen. Nur alkalische Reduktion führt verständlicherweise zur auswaschbaren Leukoform.
Als Kriterium für den Erfolg der Farbstoffixierung durch entsprechende Nachbehandlungen wurde die Haltbarkeit gegenüber Lauge, dem schnittschonenderen DMF und Sulfhydrat F gewählt. Oxydation, Verkettung der Farbstoffmoleküle durch Alkylierungsmittel und Verlackung verbessern die Stabilität besonders gegenüber DMF. Dabei tritt eine geringe Änderung des Farbtones ein. Bei Epichlorhydrin und 1,2-Dichloraethan ist diese Änderung (Farbvertiefung) erst nach längerer Zeit zu beobachten.

Die Experimente zur Vitalfärbung zeigen eine erstaunliche Verträglichkeit der zuerst untersuchten Vertreter (Hydrosollichtgrün 3B und Hydrosollichtblau FFR). Selbst Dosen von 30 Milligramm pro Tier (Maus)- intraperitoneal verabreicht - werden ohne Zeichen toxischer Wirkung toleriert. Bei einem Test, der die zur Verfügung stehenden Kochfarbstoffe umfaßte, stellte sich jedoch heraus, daß bereits 10 mg Hydrosolschwarz B bzw.Hydrosoldirektblau RL innerhalb von 12 Stunden letal wirkten.In der gleichen Versuchsreihe wurde die Auswaschbarkeit des vital aufgenommenen Farbstoffes durch verschiedene Fixierungsmittel erfaßt. Dabei zeigte sich, daß Hydrosolgrün GG und Hydrosolrotbraun 3B in ganz geringem Maße das Formol anfärben. Hingegen wird im ZENKERschen Gemisch der Farbstoff sofort oxydiert und damit fest im Substrat verankert.

Alle Injektionsversuche erbrachten nur quantitativ unterschiedliche Ergebnisse;die enterale Applikation lieferte negative Befunde.

Die histologische Untersuchung ergibt eine weitgehende Auffüllung des RES.Der Farbstoff wird aufgenommen und in granulierter Form in entsprechenden Zellen der Lymphknoten, der Milz, der Leber, der Lungen und des Bindegewebes gespeichert. Auch nach Überlebenszeiten von 2 Monaten ändert sich an diesem Bild nichts. (Abb. 6). Abweichende Befunde zeigen die beiden toxischen HYDROSOL-Farbstoffe, besonders ausgeprägt Hydrosolschwarz B : Makroskopisch scheint der Farbstoff

intensiv in Fettgewebe, Niere und Lungen eingedrungen zu sein. Mikroskopisch findet man die Glomerulumschlingen der Niere verstopft, kollagenes Bindegewebe schwach diffus tingiert und die mit Farbstoff beladenen Sinusendothelien der Leber kugelig geschwollen. Der Farbstoff ist ungewöhnlich gut fixiert, ein Auswaschen bei der Verarbeitung der Gewebsproben (Fixierung, Entwässerung, Einbettung) wird nicht beobachtet.

Damit sind günstige Voraussetzungen gegeben, die elektronenoptische Darstellbarkeit des Farbstoffes zu prüfen.Es gelingt in der Tat, mit Metallsalzen den Farbstoff ausreichend zu kontrastieren. Recht gute Ergebnisse sind zu erzielen mit Durchtränkung des Gewebsstückes vor der Aralditeinbettung mit 5 %-iger wässriger Kobaltchloridlösung. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Farbstoffspeicherung zeigt intrazellulär gelegene, von einer Membran umgebene Farbstoffgranula (Abb.7).

Auskunft über die Eigenschaften eines Farbstoffes sind nicht nur aus histologischen Untersuchungen zu erwarten. Die bisherigen Ergebnisse rechtfertigen eine eingehende Untersuchung des Farbstoffes selbst.

Im elektrischen Feld wandert der Farbstoff sowohl im Sauren (pH 1) als auch im Alkalischen (pH 13) zur Anode, ist also stets überwiegend negativ geladen.

Die Einheitlichkeit des Farbstoffes zu untersuchen boten sich zwei Verfahren an:

Die Dünnschichtchromatographie war dadurch erschwert, daß ein geeignetes Fließmittel für diese Farbstoffklasse bisher nicht bekannt ist.Nach mehreren Versuchen ist lediglich eine un-

scharfe Trennung bei Verwendung von Wasser, Methanol und Pyridin (2:1:1) gelungen. Es zeigen sich verschiedenartige Abschnitte auf den über die Wegstrecke ausgezogenen Streifen. Zu exakten Aussagen gelangt man auf diesem Wege nicht.
Die diskontinuierliche Elektrophorese dagegen zeigt scharf getrennt die einzelnen Bestandteile der Farben. Von der Hauptbande,die der Farbe des untersuchten HYDROSOL-Farbstoffs entspricht, setzen sich mehrere verschieden breite, andersfarbige Banden ab. Im histologischen Substrat sind diese Komponenten nicht nachweisbar. Nur bei Hydrosollichtgrün 3B tritt bei "saurer" Färbung (pH 1) ein gelber Farbton auf, der allerdings nicht identifiziert werden konnte.
Wegen der sehr komplexen Natur der Farbstoffe wurden die in-vitro-Versuche hier abgebrochen. Die Mitteilungen über die Eigenschaften und den Aufbau der Kochfarbstoffe, die eingangs gegeben wurden, stützen sich auf Befunde älterer Untersucher und auf Gespräche mit der Herstellerfirma CASSELLA.

E Diskussion

Das wasserlösliche Schwefelfarbstoffsortiment "HYDROSOL" läßt sich auf folgende Weise in der histologischen Technik einsetzen:

1. Aus reduzierter Flotte (methanolisch) zum Färben elastischer Strukturen.
2. Aus wässriger Flotte bei pH 8 - 11 zum Färben von Zellkernen, Nissl - Substanz, Hauptzellen des Magens, glatter und quergestreifter Muskulatur.
3. Aus wässriger Lösung bei pH 7 - 7,4 als Vitalfarbstoff mit der Möglichkeit der elektronenmikroskopischen Darstellung.
4. Die angesäuerte Flotte ist für keine besondere Anwendung geeignet.

Diesen Einsatzmöglichkeiten müssen mehrere Mechanismen zugrunde gelegt werden:

1. Wenn der Farbstoff in reduzierter Flotte dem Substrat angeboten wird, liegt er in der kleinstmöglichen Molekülform vor und befindet sich wahrscheinlich in echter Lösung. Dieses kleine Molekül der Leukoform besitzt ein vorzügliches Penetrationsvermögen und eine hohe Affinität nicht nur zu Baumwollfasern, sondern auch zu histologischem Material. Diese Affinität zeigt keine Abhängigkeit von reaktionsfähigen Gruppen ($-NH_2$, -OH, -COOH)im Substrat: Entsprechende Blockierungen haben keinen Einfluß auf den Ausfall der Färbungen. Erklärungsversuche der Hersteller für diese außerordentliche

Affinität, die eine erhebliche Konzentrierung der Leukoform an und in der Faser zur Folge hat, weisen auf bestimmte molekulare Raumbeziehungen hin.So wird als ähnlich die Einschlußverbindung des Jods in Stärke (CRAMER , 1956) angeführt . Sicherlich sind jedoch die HYDROSOL-Farbstoffmoleküle zu groß, um als Klathrate in Polysaccharide eingelagert zu werden. Als Käfigstrukturen für die Farbstoffbindung mögen allenfalls Räume der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen und Nukleinsäuren in Frage kommen. Solange sich der Farbstoff kleinmolekular als Leukoform im Schnitt befindet, ist er leicht mit schwach reduzierenden Lösungen auswaschbar;offensichtlich bestehen keine ionalen oder gar kovalenten Bindungen. Wird der Farbstoff nach der Einlagerung jedoch vernetzt,sei es einfach durch Oxydation über Disulfidbrücken, sei es mit Metallionen oder Alkylierungsmitteln, entstehen großmolekulare Produkte, die an sich schon schwer oder nicht löslich sind, welche aber außerdem den Intermicellarraum des Substrates wie ein Ausguß ausfüllen.

IMMEDIALINDON RR als wasserunlöslicher Schwefelfarbstoff ist löslich in Aceton, Methanol, Pyridin, Tetrachlorkohlenstoff und wahrscheinlich weiteren organischen Lösungsmitteln.Die in oben angedeuteter Weise im Schnitt erzeugte wasserunlösliche Farbstofform, die diesen Schwefelfarbstoffen völlig entspricht, ist jedoch mit diesen Flüssigkeiten nicht aus den Käfigstrukturen des Substrates zu entfernen.

Zum Vergleich wurde herkömmlicher Schwefelfarbstoff in redu-

zierter Flotte an histologischem Material erprobt.Erwartungsgemäß ist das Resultat das gleiche wie aus reduzierter HYDROSOL-Flotte. Nachteilig ist in beiden Fällen der hohe pH - Wert, der zur Bereitung der Leukoform benötigt wird. Die Wasserstoffionenkonzentration läßt sich jedoch ohne Beeinflussung der Färbung mit Säure bis zu einem pH von 7 wieder anheben . Andererseits konnte die Beobachtung gemacht werden, daß selbst pH-Werte von 10 und 11 den Schnitten kaum schaden, wenn sie mit Eiweißglyzerin sorgfältig aufgeklebt, unmittelbar anschließend im Thermostaten bei 40°C über Nacht getrocknet werden und nicht länger als die erforderliche Zeit (bis höchstens 30 Minuten) in der Farbflotte bleiben.

2. Wichtig für die Deutung der Färbungen aus wässrigen Lösungen ist die elektrostatische Ladung des Farbstoffes bei verschiedenen pH-Werten. Sie entscheidet über seine Zugehörigkeit zu den sauren oder basischen Farbstoffen (BAKER, 1968). HYDROSOL-Farbstoffe gehören gemäß den angegebenen Modellformeln zu den Farbsäuren. Die Thioschwefelsäuregruppen, die am Sulfidschwefel erzeugt wurden, verleihen dem Molekül negative Nettoladung, die bei pH 1 und 13 durch Kataphorese festgestellt werden kann. Der Kapillarversuch (HARMS, 1965), d.h. das Aufsaugen des Farbstoffes aus der Flotte mit Filterpapierstreifen, zeigt, daß Farbstoff und Lösungsmittel (Wasser) an derselben Front oder kurz hintereinander laufen.

Die divergierenden Ergebnisse der Färbeversuche mit verschieden zubereiteten Flotten erschweren eine Aussage über den zu-

grunde liegenden Färbemechanismus erheblich.
Kovalente Bindungen zwischen Farbstoff und Substrat werden durch die Ergebnisse der Stabilitätsprüfungen ausgeschlossen. Hingegen muß die Beteiligung von Ionenbeziehungen an der Aufnahme und Fixierung der HYDROSOL-Farbstoffe erwogen werden. Aus alkalischer Flotte färben sie saure und amphotere Gewebsbestandteile (Zellkerne, Hauptzellen, kontraktile Elemente der Muskulatur) (BAKER, 1968). Aus saurer Flotte werden basisches Kollagen gefärbt, nicht aber Erythrozyten. In beiden Fällen ist die Färbung abhängig vom Gehalt an NH_2-Gruppen im Substrat. Die schwache Restfärbung nach deren Entfernung zeigt aber noch das Typische der jeweiligen Flotte. Außerdem wird durch die Elastikazeichnung ein geringer Anteil reduzierten Farbstoffs in der alkalischen Flotte nachweisbar.
Verstärkung der positiven Nettoladung des Schnittes durch Blockade der Carboxylgruppen (FISCHER und LILLIE, 1954) hat auf die "basische" Färbung keinen Einfluß, die"saure" dagegen wird verstärkt, obwohl im benutzten pH-Bereich (3 - 1) keine wesentliche Ladungsverstärkung im Substrat mehr durch die Methylierung erwartet werden kann. Das etwas schwächere Anfärben von formolfixiertem Material läßt sich dagegen durch die Aciditätserhöhung des Substrates erklären (SEKI, 1933 b). Aus saurer und aus methanolischer Flotte aufgezogener Farbstoff läßt sich durch Harnstofflösungen höherer Konzentration zum Teil aus dem Schnitt herauslösen.
Diese Ergebnisse dürfen dahingehend interpretiert werden, daß

die betrachteten funktionellen Gruppen zwar zur Farbstoffhaftung beitragen, nicht jedoch für das entstandene Bild verantwortlich sind. Es ist wahrscheinlich, daß Ionenbindungen zwischen Farbstoff und Aminogruppen entstehen, und daß veresterte Carboxylgruppen Wasserstoffbrückenbindungen oder andere sekundäre Wechselbeziehungen mit NH_2-Gruppen oder ringständigen Stickstoffatomen des Farbstoffes eingehen, Mehrwertige Metallionen beeinflussen das Färberesultat in unterschiedlicher Weise: Das zweiwertige Magnesium wirkt auf die Eigenschaften des Farbstoffes,indem es durch Salz- und Komplexbildung Molekülform und Ladungsverteilung beeinflußt. Zugabe von Aluminiumsalzen hat eine Umladung des Farbstoffmoleküls zur Folge, wie der Kapillarversuch beweist. Gleichzeitig zieht aus dunkel gefärbter Flotte nur eine Leukoform auf (pH 4 !), deren Oxydation zwar zur Farbvertiefung, nicht aber zur Vernetzung führt. Mit Alkali ist diese Färbung schnell auszuwaschen, nur im Bindegewebe (Elastika, Kollagen) haftet sie länger (besonders bei Blau FFR). Die Vernetzung zur wasserunlöslichen Form wird wahrscheinlich durch den Aluminiumkomplex verhindert, der wie bei der Verlackung des Hämatoxylins zu völlig neuen Eigenschaften führt.

Neben dem erörterten elektrochemischen Moment beeinflußt ein mechanisches die histologische Färbbarkeit (SEKI, 1933 b) : Dichteren Gewebselementen werden durch größere Oberfläche stärkere Attraktionskräfte verliehen. Außerdem wird das Verhältnis von Maschenweite und Farbmolekülgröße die Einlagerung

wesentlich mitbestimmen. Es wurde bereits bei der Besprechung der Färbung aus reduzierter Flotte auf die Bedeutung der Konformation von Farbstoff und Färbegut hingewiesen.Auch bei den hier aufgeführten Färbetypen scheint diese Größe eine wesentliche Rolle zu spielen. Während die vorher diskutierten Kräfte den Farbstoff festhalten, bestimmen seine Gestalt und Größe vielleicht durch eine auf Adsorption beruhende Strukturaffinität den Einlagerungsort.

Die kleineren Moleküle der Leukoform und der "teilreduzierten" Form (in saurer Lösung) färben nahezu universell. Als hochdisperser Farbstoff gelingt mit der Leukoform eine intensive Darstellung der elastischen Fasern, "weil diese von dichterer Struktur sind " (SEKI, 1933 b). Die unterdrückte Kernfärbung, die bei manchen Vertretern bei Färbung aus saurer und methanolischer Lösung zu beobachten ist, mag auf eine stark herabgesetzte Dissoziation zurückzuführen sein (KULENKAMPFF, 1954). Elektive, für die Histologie interessante Färbungen sind mit der wasserlöslichen Form ,dem Bunte-Salz, zu erzielen. Das stark zur Gelbildung neigende Schwarz B wird besonders vorteilhaft zur Kernfärbung eingesetzt. Alle Kochfarbstoffe differenzieren die Zellen der Magenschleimhaut durch kräftiges Anfärben der Hauptzellen und fast völliges Aussparen der Belegzellen. Im Vergleich zu anderen Magenfärbungen ist die Genauigkeit der Darstellung hervorzuheben. HYDROSOL - Färbungen wurden im Zusammenhang mit der quantitativen elektronischen Bildanalyse (Mikrovideomat-ZEISS und Integramat-LEITZ) ge -

prüft, wobei sich vielversprechende Möglichkeiten ergaben. An der quergestreiften Muskulatur zeigen HYDROSOL-Farbstoffe bei günstiger Präparation und Fixierung des Materials regelmäßig neben I- und A-Bande auch Z- und H-Streifen.Der Färbevorgang dauert einschließlich der Fixierung des Farbstoffes mit Perjodsäure nur 10 Minuten. Bei der bisher routinemäßig geübten Eisenhämatoxylin-Färbung nach HEIDENHAIN (siehe ROMEIS, § 663) werden im Vergleich dazu für Beizung, Färbung und Differenzierung rund 50 Stunden benötigt.

Der Färbegang mit den HYDROSOL-Farbstoffen macht es besonders bequem, die PAS-Reaktion anzuschließen. Die ohnehin notwendige oxydative Fixierung in 1 %iger Perjodsäure dient gleichzeitig zur Vorbereitung der Reaktion mit SCHIFFschem Reagenz. Bei Gegenfärbungen kommen die Vorteile eines Sortimentes zur Geltung: man kann die Nuance unter Beibehaltung des Rezeptes durch Mischen der HYDROSOL-Farbstoffe beliebig variieren.

Die Reaktion des Aldehydthionins mit zuvor erzeugten SO_3-Gruppen ist an Distinktheit der Darstellung der PAS-Reaktion überlegen (PBA-Methode, SPECHT, 1970). Deswegen wurde versucht, im Zusammenhang mit dieser Färbung HYDROSOL-Farbstoffe zu verwenden. Dabei stellte sich heraus, daß die Reaktion mit Aldehydthionin zuerst abgewickelt werden muß,da anderenfalls die SO_3-Gruppen des Bunte-Salzes ihrerseits das Thionin binden. Umgekehrt kann man mit dieser Reaktion Spuren des HYDROSOL-Farbstoffes nachweisen, wie es zur Verdeutlichung schwacher Vitalfärbungen unter Umständen notwendig werden

kann.

Eine Anilinblaufärbung des Bindegewebes kann mit Hydrosolrotbraun kombiniert werden. Die Färbung ist distinkt, wenn auch das Rotbraun nicht die Leuchtkraft des Blau besitzt. Man kann das Rot durch Komplexbildung mit Aluminium etwas verbessern . Ein reines Rot als Schwefelfarbstoff ist bislang noch nicht auf dem Markt.

Sowohl die Kernfärbung aus basischer Flotte als auch die Elastikadarstellung aus reduzierter Flotte kann ohne weiteres mit sauren Farbstoffen gegengefärbt werden.

3. In den Untersuchungen zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung fand SEKI (1933 a) Farbstoffe, die, selbst negativ geladen, sowohl Gelatine als auch Celloidin gut anfärbten. Diese Farbstoffe sind"wenig diffusibel,großmolekular und schwach negativ geladen", aber leicht absorbierbar. SEKI bezweifelt die Beteiligung elektrochemischer Kräfte und bemerkt gleichzeitig, daß diese Farbstoffe in der Lage sind , granulär vital zu färben. Als allgemeine Grundlage solcher granulärer Vitalfärbung wird die leichte Flockbarkeit angeführt, die intrazellulär durch Reaktion basischer Zellbestandteile mit dem Farbstoff zu dessen Ausfällen und Fixierung führt.

MÖLLENDORFF (1918) weist auf den besonderen, noch nicht untersuchten Einfluß der Farbstoffstruktur hin und bemerkt außerdem, daß neben dem gegenseitigen Ausfällen von sauren und basischen Verbindungen an die Möglichkeit der Reduktion oder Oxydation des Farbstoffes in der Zelle gedacht werden muß.

HYDROSOL-Farbstoffe erfüllen die Bedingungen SEKIs und verbinden sie mit weiteren Vorteilen:

Zumindest einige Vertreter (Lichtblau FFR, Lichtgrün 3B, Blau R conz.) sind für Mäuse und Kaninchen in den angewandten Applikationsarten sehr gut verträglich. Nur bei den toxischen Stoffen zeigt sich eine leichte Diffusanfärbung des Bindegewebes. Die übrigen werden nur in den Zellen des RES gebunden. Die intrazelluläre Fällung der HYDROSOL-Farbstoffe ist irreversibel. Farbstoffverluste bei der nachfolgenden Aufarbeitung des Gewebes wurden nicht beobachtet. Selbst nach ZENKER-Fixierung, bei welcher PFUHL (1931) die schlechtesten Ergebnisse erhielt, bietet sich ein unverändertes Bild. Diese außerordentlich feste Farbstoffbindung kann nach den Ergebnissen der Schnittfärbungen nur durch oxydative Fixierung zustande gekommen sein. Ein besonderer Anwendungsbereich eröffnet sich durch die Möglichkeit, den Farbstoff durch Komplexbindung von Schwermetallen im Gewebe elektronenoptisch sichtbar zu machen.

Als elektronenmikroskopisch darstellbare Substanz, die ähnlich wie Vitalfarbstoffe in die Zellen aufgenommen wird, schlägt SCHMIDT (1961) ®Myofer (Hoechst) vor, das dreiwertiges Eisen an Dextran gebunden enthält und zur Eisenmangeltherapie angeboten wird. Dieser makromolekulare Stoff ist zwar ausreichend elektronendicht und läßt sich mit der Berlinerblau-Reaktion auch lichtmikroskopisch im Gewebe nachweisen, wird aber in manchen Zellen verstoffwechselt, was seinem the-

rapeutischen Einsatz entspricht (SCHMIDT, 1961).

Versuche mit Trypanblau, Neutralrot und Acridinorange zeigen meist nur Reaktionsprodukte der eingelagerten Farbstoffe mit zelleigenen Strukturen, da die Farbstoffe allein keinen ausreichenden Kontrast geben und außerdem bei der Präparateaufarbeitung zum größten Teil verloren gehen. (STOCKINGER, 1964 ; SCHMIDT, 1960 ; 1962).

Ganz anders verhalten sich die Bunte-Salze der Schwefelfarbstoffe: sie sind nach Aufnahme durch die lebende Zelle vermutlich durch Oxydationsprozesse sehr stabil fixiert und lassen sich leicht kontrastieren. Für die Aufnahme von Metallionen stehen zwei Mechanismen zur Verfügung: die Salzbildung mit nicht vernetzten Merkaptogruppen und bei einigen Vertretern die Bildung zweier Chelate (bei Lichtgrün 3B,Rotbraun 3B und Lichtblau FFR). Damit werden im Optimalfalle vier Metallionen pro Farbstoffmolekül gebunden, doch reicht zur Darstellung bereits die Salzbildung allein (Die Abbildungen 6 und 7 stammen von einem Versuch mit Blau R conz.).

Um nachzuweisen, daß mit der angegebenen Kontrastierung der Farbstoff und nicht Folgeprodukte seiner Speicherung abgebildet werden, mußte ein Metall benutzt werden,welches keine Gewebsbestandteile kontrastiert. Mit Eisensulfat ist dieser Nachweis gelungen.

F Anwendungsbeispiele und Färberezepte

Abb.1 a - c : Färbungstypen, dargestellt am Beispiel von Hydrosolschwarz B.
Niere, Ratte; Fixierung: BOUIN.

a) Färbung aus reduzierter Flotte: (Elastika)
50 ml 1 %ige wässrige Lösung von Hydrosolschwarz B + 2 ml Sulfhydrat F (= 21-prozentige wässrige Lösung von NaSH)
Färbezeit : 5 min , Aqua dest. : 5 min
Perjodsäure, 1%ig : 1 min (Oxydation !)
Aqua dest., aufsteigende Alkoholreihe , Xylol, Caedax.(Der Arbeitsgang ab Aqua dest. wird im folgenden Einbettung genannt.)

b) Färbung aus saurer Flotte:
1 %ige wässrige Lösung von Hydrosolschwarz B mit n/10 HCl auf pH 2 eingestellt.
Färbezeit: 30 min, Aqua dest., Einbettung.

c) Färbung aus basischer Flotte :
10 %ige wässrige Lösung von Hydrosolschwarz B.
Färbezeit: 20 min, Perjodsäure,1%,:1 min
(Fixierung des Farbstoffes durch saure Oxydation!)
Aqua dest., Einbettung.

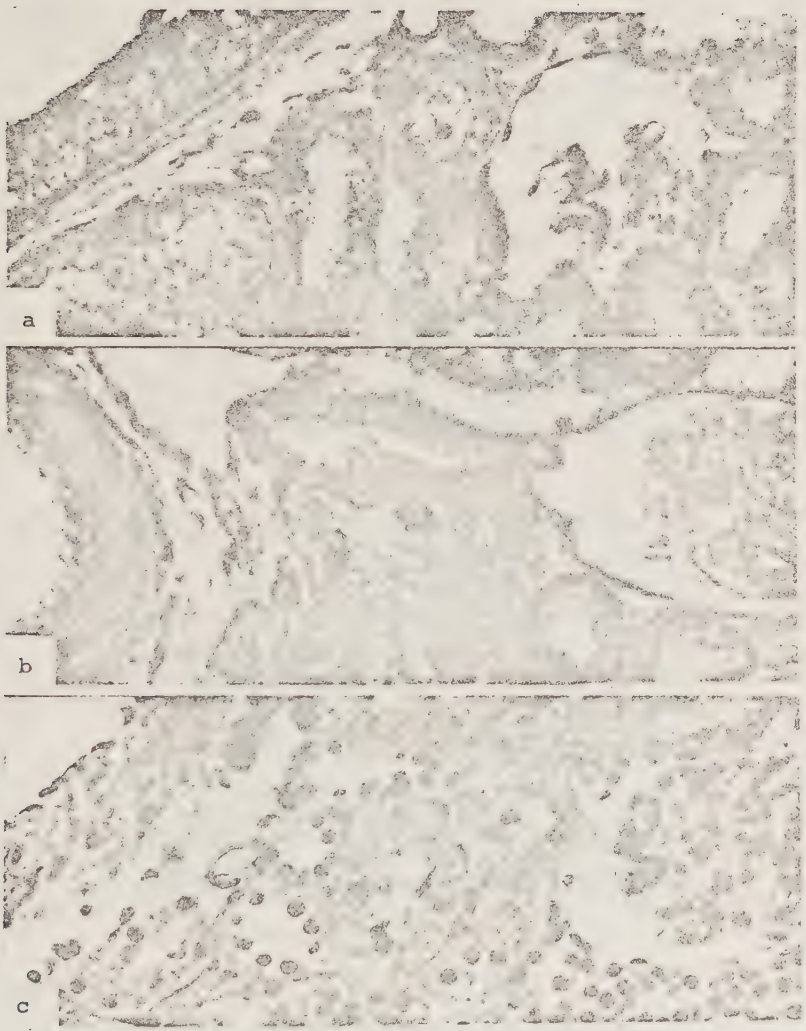


Abb. 1 a - c : Färbungstypen

a) Färbung aus reduzierter Flotte

b) Färbung aus saurer Flotte

c) Färbung aus basischer Flotte

Abb. 2 a und b : HYDROSOL-Farbstoffe zur Darstellung elastischer Strukturen :

Arterie, Rind; Fixierung : BOUIN.

a) Elastica interna.

b) elastische Fasern der Adventitia.

Gesättigte Lösung von Hydrosollichtblau FFR in Methanol (ca. 1 g Farbstoff auf 100 ml),filtrieren, +2 ml Sulfhydrat F auf 100ml Lösung (= Reduktionsschritt).

Färbezeit : 5 min, Aqua dest.: 5 min

Perjodsäure, 1%, 1 min (Oxydation) .

Aqua dest.: 2 min.

Gegenfärbung mit ^{R}Levafixrubin (1%ig wässrig, mit n/10 HCl eingestellt auf pH 2 ; Färbezeit : 2 min).

Aqua dest., Einbettung.

(LEVAFIX ist ein Reaktiv-Farbstoffsortiment der Firma Farbenfabriken Bayer AG Leverkusen. Levafixrubin PFR wird hier als saurer Farbstoff, also nicht reaktiv, eingesetzt.)

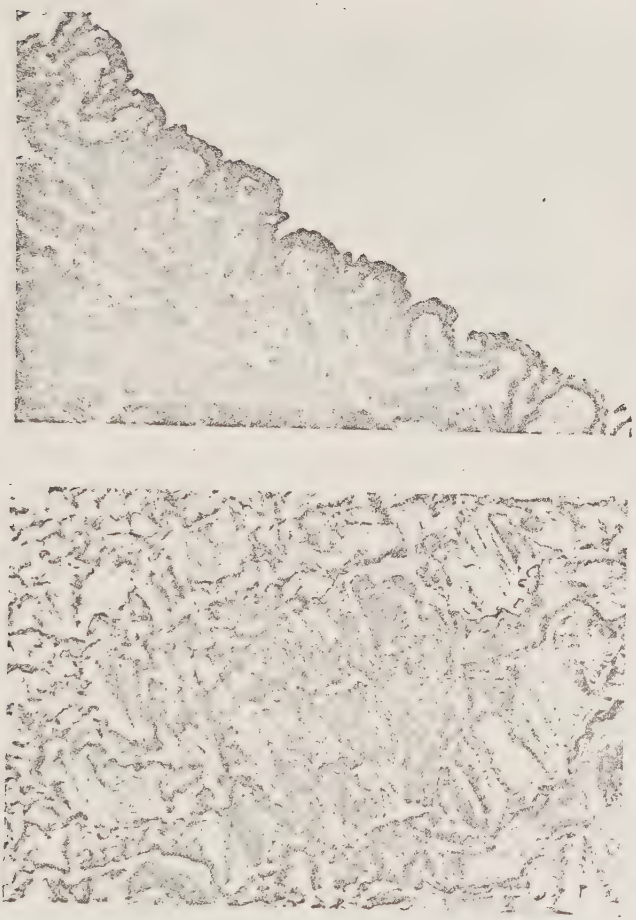


Abb. 2 a und b : Darstellung elastischer Strukturen

a) Elastica interna

b) elastische Fasern der Adventitia

Abb. 3 a und b : HYDROSOL-Farbstoffe zum Färben quergestreifter Muskulatur:

a) Skelettmuskulatur, Mensch; Fixierung: Formol.
1 %ige wässrige Lösung von Hydrosollichtblau FFR.
Färbezeit: 5 min
Aqua dest.:1 min
Perjodsäure, 1%ig: 2 min,
Aqua dest., Einbettung.

b) Herzmuskulatur ,Rind; Fixierung: BOUIN.
Hydrosolrotbraun und Anilinblau wie unter Abb.4 beschrieben.

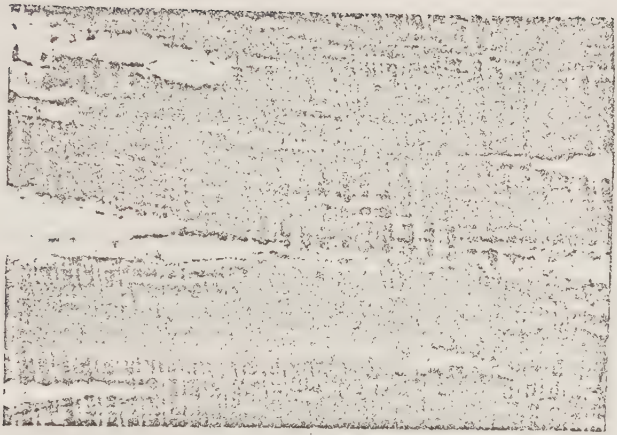


Abb. 3 a und b : Darstellung quergestreifter Muskulatur

a) Skelettmuskulatur

b) Herzmuskulatur

Abb. 4 a und b: Hydrosolrotbraun 3B kombiniert mit einer Anilinblaufärbung:

a) Duodenum, Mensch; Fixierung Formol. (Zottenmuskulatur!)

b) Leber, Kaninchen; Perfusionsfixierung: BOUIN.
1 %ige wässrige Lösung von Hydrosolrotbraun 3B, Färbezeit : 20 min.
Aqua dest.: 1 min
Phosphorwolframsäure, 5 %ig : 5 min
Aqua dest.: 5 min
Anilinblaulösung : 5 min (0,5 %ig in n/10 Essigsäure nach SPECHT).
Aqua dest., Einbettung.

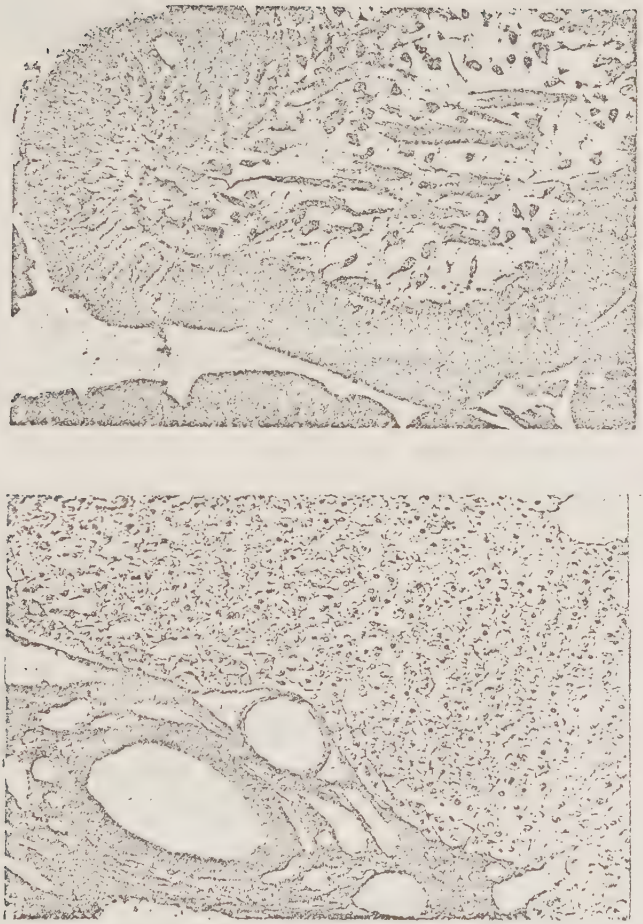


Abb. 4 a und b : Kombination mit Anilinblau

a) Duodenum

b) Leber

Abb. 5 a und b : HYDROSOL-Farbstoffe zum Differenzieren der Haupt- und Belegzellen des Magens:

Magen,Fundus,Mensch; Fixierung: BOUIN.

a) 0,4g Hydrosollichtgrün 3B und 0,6g Hydrosolgelb RR in 100 ml H_2O lösen. Färbezeit: 20 min, Aqua dest.: 5 min, Perjodsäure, 1% : 10 min, Aqua dest.: 5 min, SCHIFFsches Reagenz : 20 min, SO_3-Wasser: 3 mal 5 min, Aqua dest., Einbettung.

Statt des angegebenen Gemisches von Hydrosollichtgrün und Hydrosolgelb können auch die anderen Kochfarbstoffe eingesetzt werden. Dabei werden die Belegzellen im gleichen Ton gefärbt wie die Hauptzellen, aber sehr viel blasser.

b) Nebenzellen werden dunkelblau, Hauptzellen dunkelrot und Belegzellen blassrosa dargestellt mit folgender Färbung:
PBA-Reaktion nach SPECHT:
Perjodsäure 1%ig,:10 min, Natriumbisulfit, 20%, 15 h, 3 mal Aqua dest.,5 min,Aethanol, 70%ig, 5 min, Aqua dest., 5 min.
Hydrosolrotbraun 3B 1%ig wässrig, 15 min.
$AlCl_3$, 2%ig wässrig, 30 min.(Die Fixierung durch Komplexbildung mit Aluminium erhöht die Leuchtkraft des Rot). Aqua dest., Einbettung.

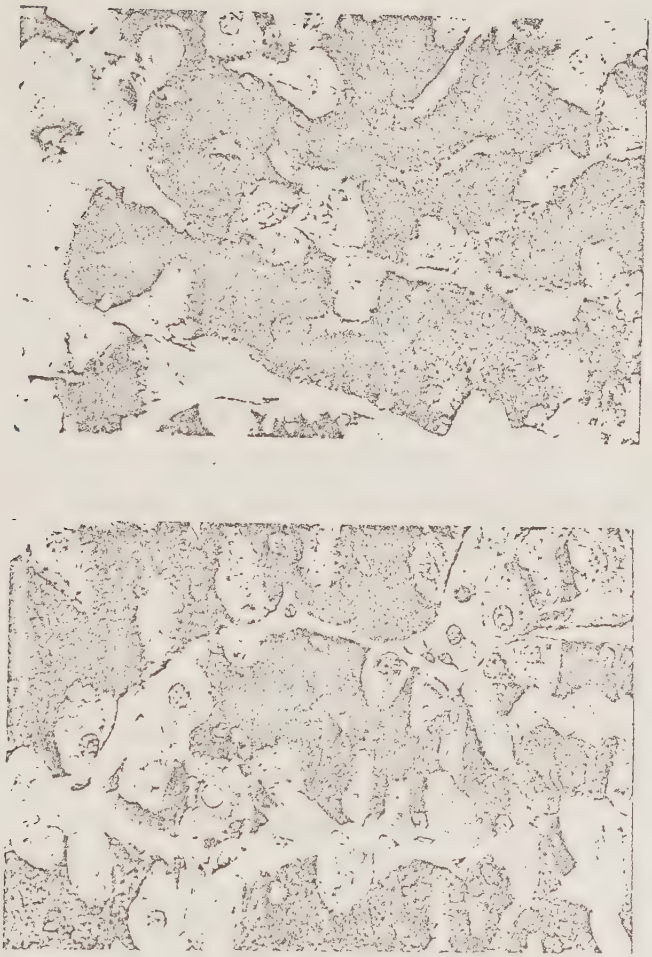


Abb. 5 a und b : Darstellung der Magenzellarten

a) Kombination mit PAS-Reaktion

b) Kombination mit PBA-Reaktion

Abb. 6 a und b : HYDROSOL-Farbstoffe zur Vitalfärbung:

a) Mesenterium, weiße Maus; Fixierung: Formol; nach i.p.Gabe von Hydrosol-lichtblau FFR (10 mg).
1 %ige wässrige Lösung von Hydro - sollichtblau FFR wird mit n/10 HCl auf pH 7,4 eingestellt. 1 ml i.p., Organentnahme nach 16 h, übliche Aufarbeitung zum Paraffinschnitt, Gegenfärbung mit Kernechtrubin.

b) Lymphknoten, weiße Maus; Fixierung: Glutaraldehyd.
nach s.c.Gabe von Hydrosolblau R conz. (30 mg).
0,5 %ige wässrige Lösung von Hydrosolblau R conz. wird mit n/10 HCl auf pH 7,4 eingestellt. 12 mal 1 ml s.c., Organentnahme nach 2 Monaten.
Araldite einbettung, Semidünnschnitt, Gegenfärbung mit Azur II- Methylen-blau.

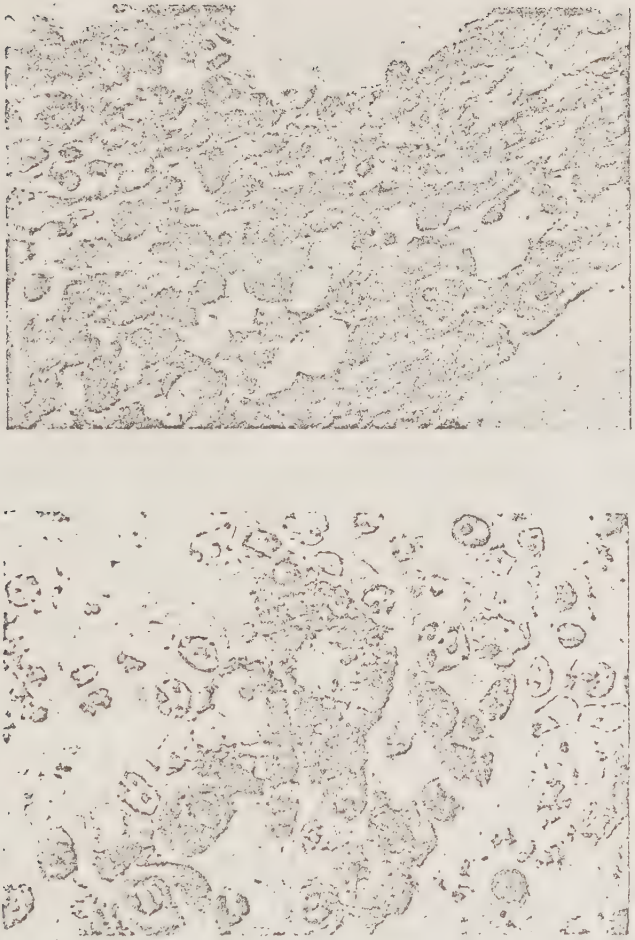


Abb 6 a und b : Darstellung des RES durch Vital-Färbung

a) Makrophagen im Mesenterium

b) Makrophagen im Lymphknoten

Abb. 7 a-c : HYDROSOL-Farbstoff im Elektronenmikroskop:

Material wie bei Abb.6 b beschrieben.

a) Übliche Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Stückdurchtränkung mit $CoCl_2$, 5 %ig wässrig, 9 h . Material von 5.1. (Material und Methode, Seite 18).

b) Schnittkontrastierung mit $CoCl_2$ (5.5.a.)

c) Nachweis des Farbstoffs mit $FeSO_4$ (5.5.b.)

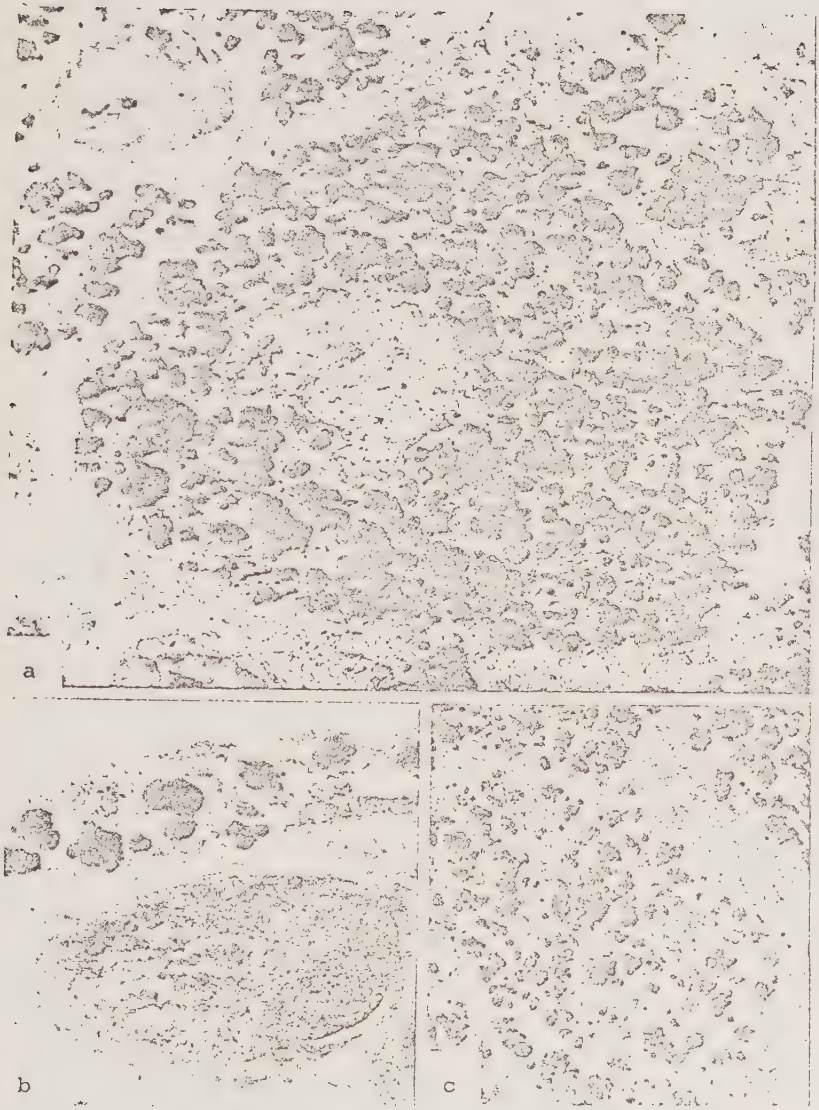


Abb. 7 a-c : HYDROSOL-Farbstoffe im Elektronenmikroskop

Zur Haltbarkeit der Flottenansätze:

1. Reduzierte Flotten sind nur einen Tag haltbar, da an der Oberfläche bald die Luftoxydation einsetzt und sich Krusten der unlöslichen Form (IMMEDIAL-Farbstoff) bilden.
2. Rein wässrige Lösungen sind unterschiedlich lange haltbar (Wochen bis Monate). Wenn der pH-Wert unter 8 abgesunken ist, sollte man die Lösung verwerfen.
3. Zur Vitalfärbung bestimmte Flottenansätze müssen vor jeder Injektion auf den richtigen pH-Wert nachgestellt werden. Auch hier muß die Lösung erneuert werden, wenn der Farbstoff in der unlöslichen Form ausfällt.

G Zusammenfassung

Nach ausführlicher Vorstellung des wasserlöslichen Schwefelfarbstoffsortiments "HYDROSOL" der Firma Cassella wird über Färbeversuche an Paraffinschnitten und über Vitalfärbungen berichtet. Es stellt sich heraus, daß dieses Sortiment sich vielfältig einsetzen läßt.

Als Ursache der Färbeergebnisse werden nach histochemischen Untersuchungen und Veränderungen des Farbstoffmoleküls Strukturbeziehungen zwischen Farbstoff und Substrat verantwortlich gemacht.

HYDROSOL-Farbstoffe lassen sich als Vitalfarbstoffe zur Markierung der Zellen des RES einsetzen. Ihre außerordentlich stabile, granuläre Speicherung kann ohne Farbstoffverlust jedem Aufarbeitungsprozess unterworfen werden.

Mit Schwermetallsalzen gelingt es, die Farbstoffe elektronendicht zu kontrastieren, so daß submikroskopische Untersuchungen der Farbstoffaufnahme und des -transportes möglich werden.

H Literatur

1. BAKER, J. R. : Principles of biological microtechnique. London: Methuen & Co., Ltd. 1968.

2. CRAMER, F.: Einschlußverbindungen. Angew. Chem. 68, 115-120 (1956).

3. FISHER, E. R., LILLIE, M. D. : The effect of methylation on basophilia. J. Histochem. Cytochem. 2, 81-87 (1954).

4. HARMS, H.: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Kamp-Lintfort: Staufen-Verlag 1965.

5. HEID, C.: Die HYDROSOL-und HYDROSOLLICHT-Farbstoffe, ein Sortiment wasserlöslicher Schwefelfarbstoffe. Eigenschaften und ihre Anwendung. Z. ges. Textilindustrie 65, 1028-1031 (1963).

6. HEID, C.: Eigenschaften sowie Anwendung der HYDROSOL- und HYDRONBLAU F. SOL-Farbstoffe unter Berücksichtigung des Pad-Roll-Verfahrens. Mitteilungen aus der Coloristischen und Anwendungstechnischen Abteilung der Cassella Farbwerke Mainkur AG, 1965.

7. KLOPFSTOCK, C., TITZKA, W.: Über die Anwendung der IMMEDIAL-Farbstoffe HYDROSOL in der Apparate- und Stückfärberei. Melliand Textilber. 41, 64-67 (1960).

8. KULENKAMPFF, H.: Zur Technik der Gefriertrocknung histologischer Präparate. Z. wiss. Mikrosk. 62, 427-438 (1954/55).

9. LANGE, O.: Die Schwefelfarbstoffe. Leipzig: Verlag Otto Spamer 1912.

10. MÖLLENDORFF, W.v.: Die Bedeutung von sauren Kolloiden und Lipoiden für die vitale Farbstoffbindung in der Zelle. Arch. mikr. Anat. 90, 503-542 (1918).

11. MÜLLER, J.: Über die Anwendung wasserlöslicher Schwefelfarbstoffe. Textil-Praxis 13, 613-616 und 731-736 (1958).

12. OTTO, G.: Das Färben des Leders. Darmstadt: Eduard Rother-Verlag 1962.

13. PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied. 2nd ed. Boston: Little,Brown and Company 1960.

14. PFUHL, W.: Untersuchungen über die Fixierung der vitalen Trypanblauspeicherung. Z. Zellforsch. 8, 783-803 (1931).

15. RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie GmbH 1963.

16. RINNEBERG, K.A.: IMMEDIAL-Farbstoffe, ihre Entwicklung und Anwendung. Textil-Praxis 12, 1137-1141 (1957).

17. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. 16. Aufl. München-Wien: R. Oldenbourg Verlag 1968.

18. SCHMIDT, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung von Trypanblau in den Zellen des Hauptstückes der Niere. Z. Zellforsch. 52, 598-603 (1960).

19. SCHMIDT, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen des intrazellulären Stofftransportes in der Dünndarmepithelzelle nach Markierung mit Myofer. Z. Zellforsch. 54, 803-806 (1961).

20. SCHMIDT, W.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die intrazelluläre Verarbeitung von Vitalfarbstoffen. Z. Zellforsch. 58, 573-637 (1962).

21. SCHUBERT, M.: 50 Jahre IMMEDIAL-Farbstoffe. Melliand Textilber. 28, 270-272 (1947).

22. SEKI, M.: Zur phyikalischen Chemie der histologischen Färbung. VIII. Über die Umladung und Flockung von Farben durch Wasserstoffionen und eine Bemerkung über die vital färbenden Farbstoffe. Z. Zellforsch. 18, 1-20 (1933a).

23. SEKI, M.: Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung. IX. Über den Einfluß der Fixierung auf die Färbbarkeit histologischer Elemente. Z. Zellforsch. 18, 21-55 (1933b).

24. SEKI, M.: Zur Kenntnis der intra- und supravitalen Färbung. VIII, Vitalfärbung mit künstlichen Beizenfarbstoffen. Z. Zellforsch. 22, 720-723 (1935).

25. SPANNHOF, L.: Einführung in die Praxis der Histochemie. 2.Aufl.Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1967.

26. SPECHT, W.: Färben mit Aldehydthionin. Eine Methode für den topochemischen Nachweis von Sulfonsäuren und Aldehyden. Demonstration, 65. Vers. Anat. Ges.,Würzburg 1970.

27. SPECHT, W.: unveröffentlichte Befunde.

28. STOCKINGER, L.: Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen.
In: Handbuch der Protoplasmaforschung hrsg.v. M. ALFERT, H. BAUER, C.V. HARDING, Bd. II/D1
Wien: Springerverlag 1964.

29. ZERWECK, W., RITTER, H., SCHUBERT, M.: Zur Konstitution der Schwefelfarbstoffe.
Angew. Chem. 60, 141-147 (1948).

30. D.R.P. 88392 : Verfahren zur Darstellung von zum Druck geeigneten Verbindungen aus Schwefelfarbstoffen und Alkalisulfiten (1895).

31. D.R.P. 225314 : Verfahren zum Fixieren von Schwefelfarbstoffen beim Färben und Drucken (1908).

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die intensive zeitliche Zuwendung sowie die Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. med. W. Specht.

Lebenslauf

Am 20. Februar 1949 wurde ich als zweiter Sohn des Arztes Dr. med. Wolfram Stober und seiner Ehefrau Irmgard geb. Haunert in Naumburg/Saale geboren. 1957 verließen wir die sowjetisch besetzte Zone Deutschlands.
Von 1959 bis Frühjahr 1966 besuchte ich das Realgymnasium Homburg/Saar, anschließend das Realgymnasium Völklingen , wo ich 1967 das Zeugnis der Reife erwarb.
Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes. Dort bestand ich im Sommer 1968 die naturwissenschaftliche und im Frühjahr 1970 die ärztliche Vorprüfung.
Nach dem Sommersemester 1971 wechselte ich an die Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Hier legte ich am 27.7.1973 die ärztliche Prüfung ab.